

令和元年6月1日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10810

研究課題名（和文）Wntシグナル活性化因子RSP02に焦点をあてた後縦靭帯骨化症の病態解明

研究課題名（英文）Function of RSP02 in progression of OPLL

研究代表者

松林 嘉孝（Matsubayashi, Yoshitaka）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50747962

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：頸椎後縦靭帯骨化症（頸椎OPLL）のGWASで同定された疾患修飾候補遺伝子のひとつであるRSP02のOPLL発症および伸展における機能解明を目指して研究を行った。手術で採取したOPLL疾患群の靭帯サンプルでの発現解析や実際の骨化標本での発現解析や各種細胞を用いた機能解析からRSP02の機能亢進がOPLLの発症や伸展に関与しているという証左をえた。RSP02を過剰発現するトランスジェニックマウスを作出するところまでいったため、引き続きの研究でマウスを用いた実証実験を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頸椎OPLLは日本を含めた東南アジア圏に多いことが知られており、いったん有症状化すると脊髄麻痺に起因する強いADL障害を来すことからその克服は喫緊の国家的課題である。本研究によりRSP02が将来的な頸椎OPLLの分子標的治療薬のターゲットとなりうることが示された。OPLLに対する創薬はいまだ実現しておらず進行時に外科的治療しかないのが現状で、予防的治療は皆無に等しい。本研究はその点で新たな進行予防薬の創薬につながる可能性があり、非常に有意義なものであるといえる。

研究成果の概要（英文）：We herein demonstrated that RSP02, one of the activators of the canonical Wnt signaling, is highly expressed in posterior longitudinal ligament, and also RSP02 promotes osteogenic differentiation of the mesenchymal stem cells. These results revealed that gain-of-function of RSP02 is associated with the on-set or progression of ossification of posterior longitudinal ligament (OPLL). Our results suggests that RSP02 can be the therapeutic target of OPLL in the future.

研究分野：脊椎外科

キーワード：頸椎後縦靭帯骨化症 RSP02 Wnt経路 OPLL

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

後縦靭帯骨化症(Ossification of Posterior Longitudinal Ligament: OPLL)は脊柱管内の後縦靭帯が骨化し、その骨化巣が徐々に増大して脊髄を圧排することで進行性の脊髄麻痺による四肢麻痺や対麻痺を呈する疾患である。本邦での罹患頻度が高いこと、また30歳台などの比較的若年から進行性の重篤な脊髄症状を呈する症例がいること、本疾患の30%程度が経過中に脊髄症状を呈し手術加療を要すること、などから本邦では厚生労働省の指定する難治性疾患克服研究事業の対象疾患となっており、本疾患の克服は喫緊の課題であると言えるが、本疾患の発症にいたる分子生物学的なメカニズムはまったく明らかになっておらず、その根治的な治療法は足がかりさえつかめていない。2014年に本疾患における本邦発の多施設研究によるゲノムワイド関連解析(GWAS)が行われ、ようやく本疾患の発症に關与する複数の遺伝子候補が明らかとなったところであった。<sup>1)</sup>

## 2. 研究の目的

上述のGWASによって明らかとなった複数のOPLLの疾患修飾候補遺伝子のうち、骨形成に重要な機能を有することが知られているWntシグナルの活性化因子であるRSPO2に着目し、RSPO2が後縦靭帯骨化症の発症および進行に關与する分子メカニズムを明らかにし、最終的に後縦靭帯骨化症に対する根治的な治療標的を同定することを目的として本研究を開始した。

## 3. 研究の方法

本研究は以下のサブテーマにわけて実験・解析を行った。

SNP rs374810 の機能解析

RSPO2 のプロモーター解析 (rs374810 A/G の違いによるルシフェラーゼ活性の検討)

RSPO2 の発現解析

-1. 組織パネルにおけるRSPO2発現解析

-2. ヒト疾患サンプルを用いた詳細な発現解析

RSPO2 の分子生物学的機能解析およびOPLL発症における機能の解明

-1. *in vitro* での gain-of-function および loss-of-function の検討

-2. RSPO2 トランスジェニックマウスの作成

## 4. 研究成果

本研究において下記の結果をえた。上記の各サブテーマごとにおいて成果を報告する。

SNP rs374810 の機能解析

GWASによって得られた疾患関連SNPであるSNP rs374810はRSPO2の転写開始点1kb程度上流に位置し、RSPO2遺伝子のプロモーター領域に存在するため本SNPがRSPO2の発現そのものに直接關与している可能性を考え、本SNPを含むRSPO2のプロモーター領域をクローニングし、1塩基置換を行うことでリスクアレルと非リスクアレルにおけるルシフェラーゼ活性を解析した。軟骨系細胞での解析においてリスクアレルにおいてルシフェラーゼ活性が高いことが確認され、リスクアレルにおいてRSPO2の発現が亢進する可能性が示唆された。

-1. 組織パネルにおけるRSPO2発現解析

ラット・マウス組織パネルを独自に作成し、RSPO2の発現解析を行ったところ、黄色靭帯や後縦靭帯などの脊椎周囲靭帯でRSPO2が高発現していることが確認された。

-2. ヒト疾患サンプルを用いた詳細な発現解析

ヒト頸椎OPLL群とヒト頸髄症群の手術で得られた黄色靭帯サンプルでの発現比較においてOPLL群でRSPO2の発現が有意に高いことを見出した。また頸椎OPLLの術中サンプルを用いた免疫染色において、OPLLの骨化前線部の靭帯骨化層移行部においてRSPO2が限局して高発現していることが確認された。

以上の結果からRSPO2がWnt経路活性化因子として報告されていることとあわせてRSPO2のgain-of-functionがOPLLの発症や伸展に關与していると考えた。

-1. *in vitro* での gain-of-function および loss-of-function の検討

以上の結果からRSPO2のgain-of-functionの系を中心に解析することとした。まず手術で得た黄色靭帯からCD90陽性の間葉系幹細胞とCD90陰性の靭帯細胞をフローサイトメーターを用いて分離培養する系を確立した。続いて同系にて得られたCD90陽性の靭帯内間葉系幹細胞群にRSPO2を添加することで実際に骨芽細胞分化が誘導されることを確認した。一方、CD90陰性の靭帯細胞群ではRSPO2の発現そのものは高いものの、RSPO2添加による骨芽細胞分化は見られなかった。以上のことからOPLLでは成熟靭帯細胞が分泌するRSPO2が靭帯細胞内の間葉系幹細胞に作用することで靭帯内の骨化が誘導されていると考えられた。

またOPLLはメカニカルストレスのかかる部位で進展悪化し、制動すると進展が停止も

しくは小康することが知られているが、実際に靭帯細胞系のセルラインとして知られるTT-D6に *in vitro* で伸展ストレスのメカニカルストレスをかけることでRSPO2の発現が上昇することも確認でき、靭帯内では靭帯にメカニカルストレスがかかることで靭帯細胞でのRSPO2の発現・分泌上昇が亢進している可能性が示唆された。

#### -2. RSPO2 トランスジェニックマウスの作成

最後にRSPO2のCre誘導性トランスジェニックマウスを作成し、解析を行った。RSPO2がCre発現下に過剰発現することが確認され、トランスジェニックマウスとして正常に動作していることまで確認された。CAG-creマウスやScx-creマウスを交配することで実際に靭帯骨化症が誘導できるかを検討したが現時点では、靭帯骨化が確認されるには至っておらず現在も交配と解析を継続しているところである。

#### 引用文献

1) Nakajima M, Taniguchi Y, (他 31 名、11 番目). A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nat Genet.* 2014 Sep;46(9):1012-6.

#### 5. 主な発表論文等

Anno M, Oshima Y, Taniguchi Y, Matsubayashi Y, Kato S, Soma K, Oka H, Hayashi N, Tanaka S. Prevalence and Natural Course of Transverse Ligament of the Atlas Calcification in Asymptomatic Healthy Individuals. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2018 Dec 15;43(24):E1469-E1473.

Matsubayashi Y, Chikuda H, Oshima Y, Taniguchi Y, Fujimoto Y, Shimizu T, Tanaka S. C7 sagittal vertical axis is the determinant of the C5-C7 angle in cervical sagittal alignment. *Spine J.* 2017 May;17(5):622-626.

〔雑誌論文〕(計 2 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

相馬一仁 他 『頸椎後縦靭帯骨化症の疾患感受性候補遺伝子RSPO2の検討』

日本整形外科学会基礎学術集会 2017年

相馬一仁 他 『頸椎後縦靭帯骨化症の疾患感受性候補遺伝子RSPO2の検討』

日本整形外科学会学術集会 2017年

相馬一仁 他 『頸椎後縦靭帯骨化症の疾患感受性候補遺伝子RSPO2の検討』

日本骨代謝学会 2017年

Kazuhito Soma etc. Roles of R-spondin2; the susceptibility gene for ossification of posterior longitudinal ligament. Annual Meeting of Orthopaedic Research Society 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等:該当なし

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：筑田 博隆

ローマ字氏名：Chikuda Hirotaka

所属研究機関名：群馬大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：30345219

研究分担者氏名：斎藤 琢

ローマ字氏名：Saito Taku

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号（8桁）：30456107

研究分担者氏名：谷口 優樹

ローマ字氏名：Taniguchi Yuki

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号（8桁）：80722165

### (2)研究協力者：該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。